

みにれびゅう

膜貫通型 FLRT タンパク質による *Unc5* 陽性神経細胞に対する反発作用

山岸 覚

1. はじめに

発生過程において神経細胞は遠隔地のターゲットへと軸索を伸長し、複雑な回路網を短期間のうちに正確・精巧に形成する必要がある。この厳密に制御された回路形成には誘引性・反発性の軸索ガイダンス因子によるナビゲートが必要であることが知られている。このようなガイダンス分子としてネトリン・セマフォリン・エフリン等が知られているが、まだ未知の因子が多数存在すると考えられる。我々は、近年、膜貫通型 FLRT (fibronectin leucine-rich transmembrane protein) ファミリーが新規反発性神経ガイダンス分子であることを見いだした¹⁾。FLRT ファミリーはメタロプロテアーゼによってプロセシングを受け、N 末端が細胞外へと放出される。この N 末端ドメインはネトリン受容体として知られている *Unc5* ファミリーに結合してリガンドとして反発活性をもたらしていた。本稿において反発因子 FLRT2 の海馬神経細胞および大脳皮質上層細胞におけるガイダンス因子としての機能を概説する。

2. FLRT ファミリー分子について

1999 年に細胞外マトリックス分子として I 型膜貫通型 FLRT1 がクローニングされ、同時にそのファミリー分子 FLRT2, FLRT3 が報告された²⁾ (図 1)。哺乳類には三つのファミリー分子が存在する。*Flrt* 遺伝子は脊椎動物にのみ見いだされ、ショウジョウバエや線虫等無脊椎動物においては相同遺伝子がない。非常に特徴的なのは、マウス・ヒトともにすべてのファミリー分子をコードする遺伝子が単一エクソンから構成されていることである。単一エクソンであることから、スプライシングバリエーションも存在しない (図 1A)。すなわち、FLRT 遺伝子は、単一エクソンの挿

入により誕生し、その後三つに分かれた遺伝子であると考えられる。ただし、マウス *Flrt2* の 5' UTR をコードするエクソン 1 はタンパク質をコードする配列を含むエクソン 2 から 85 kbp も離れており、遺伝子長は約 93 kbp にも及ぶ。タンパク質は約 660 個のアミノ酸から構成され、分子量は 8 万~10 万である (図 1)。FLRT1 と FLRT3 が最も高いアミノ酸配列の相同性を示し、55% の同一性がある。FLRT1 と FLRT2, FLRT2 と FLRT3 はこれに対してやや低い。細胞外にはシステインリッチドメイン、ロイシンリッチリピート (LRR)、フィブロネクチン III 型 (FNIII) ドメインを持つ 1 回膜貫通型タンパク質であり、細胞内ドメインには約 100 アミノ酸から構成される C 末端が存在する。LRR ドメインによってホモフィリックに結合し、接着分子として機能する³⁾。その一方で、FLRT3 細胞内ドメインと Rnd1 の結合はカドヘリンの細胞内取り込みを促進し、脱接着に機能するというまったく逆の作用も報告されている⁴⁾。また、アフリカツメガエル FLRT3 の FNIII ドメインは線維芽細胞増殖因子受容体 1 (FGFR1) と結合し、FGF シグナルの活性化に関与している⁵⁾。FLRT3 ノックアウトマウスでは胎生 7 日齢の臓側内胚葉 (AVE) に穴が開き、胚が羊膜外で発生したり、頭部閉塞不全が生じたりする⁶⁾。また、FLRT3 は脊髄損傷後に発現上昇が観察され、後根神経節や小脳顆粒細胞における神経突起・軸索伸長活性も報告されている^{7,8)}。なお、セアカゴケグモ等から分泌される神経毒ラトロトキシンの受容体であるラトロフィリンはこの FLRT3 に高親和性に結合し、スパイン形成に関与していることも 2012 年に報告されている⁹⁾。

3. FLRT のプロセシングと *Unc5* との結合

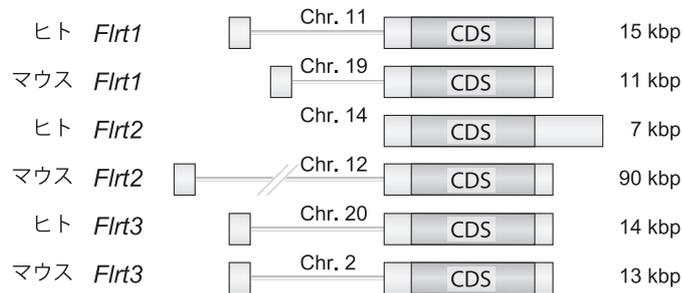
興味深いことに FLRT ファミリーはプロセシングを受けており、*in vitro* および *in vivo* において FLRT1, 3 は 1 種類、FLRT2 は 2 種類の N 末端ドメインが細胞から切り出される (図 1B)¹⁾。これらはメタロプロテアーゼ (MMP) 阻害剤である TAPI-0, TAPI-1 で抑制されることから、MMP によって切られている¹⁾。また、切断箇所をマッピングしたところ、膜貫通型ドメイン近傍にて切断されていた。FLRT2 にはこの領域に N 型糖鎖修飾部位があり、これを挟むように 2 か所切断を受けている (図 1B)。

浜松医科大学解剖学講座神経機能学分野 (〒431-3192 静岡県浜松市東区半田山 1-20-1)

FLRT family proteins act as repulsive guidance cues for *Unc5*-positive neurons

Satoru Yamagishi (Department Anatomy and Neuroscience, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handa-yama, Higashi-ku, Hamamatsu, Shizuoka 431-3192, Japan)

A



B

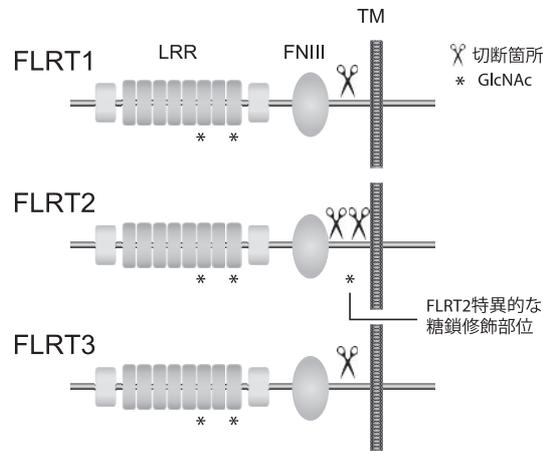


図1 FLRTファミリー遺伝子および分子構造

(A) マウスおよびヒト *Flrt1-3* 遺伝子のコーディングシーケンスはすべて単一エクソンから構成される。マウス *Flrt2* は第一エクソンが解離しており、全長約 90 kbp にも及ぶ。(B) FLRT1~3 は細胞外にロイシンリッチリピート (LRR)、システインリッチドメイン (黄四角)、フィブロネクチンⅢ型 (FNIII) から構成される約 660 アミノ酸の膜貫通型タンパク質である。分子量は約分子量は 8 万~10 万。*は N 型糖鎖付加箇所、ハサミはメタロプロテアーゼによる切断箇所を示す。

さて、切断された FLRTs の機能は一体何なのであろうか？ 2009 年に アフリカツメガエルとゼブラフィッシュ FLRT3 がネトリン受容体である Unc5B と結合することが相次いで報告された^{10,11)}。しかしながら、Unc5-FLRT の相互作用はシス結合 (同細胞内) なのか、トランス結合 (異細胞間) なのか、さらに FLRT3 以外の FLRT ファミリー分子と Unc5 ファミリー分子が結合するかは不明であった。そこで我々は哺乳類における FLRT1-3 と Unc5A~D に注目し、すべての組み合わせで結合実験を行った。その結果、FLRT 細胞外ドメインは Unc5 ファミリーとトランス結合してリガンドとして機能すること、特に FLRT2 と Unc5D ($K_d=11$ nM), FLRT3 と Unc5B ($K_d=66$ nM) が高親和性に結合することを見いだした (図 2A)。また、

FLRT2 は Unc5B 受容体とも結合するが、Unc5D ほどは親和性が高くなかった。以上の結果から、切断された FLRT2 や FLRT3 の N 末端ドメインは Unc5B、Unc5D リガンドとして機能することが明らかとなった。

4. 反発性軸索ガイダンス因子としての FLRT2, FLRT3

FLRT ファミリーにもネトリン同様、Unc5 を介した反発性ガイダンス因子として活性があるかを調べるため、ストライプアッセイを行った (図 3A,B)。蛍光ラベルした FLRT2 を基質としてストライプ状にコートし海馬神経細胞を培養したところ、24 時間内に 8 割以上の神経細胞が

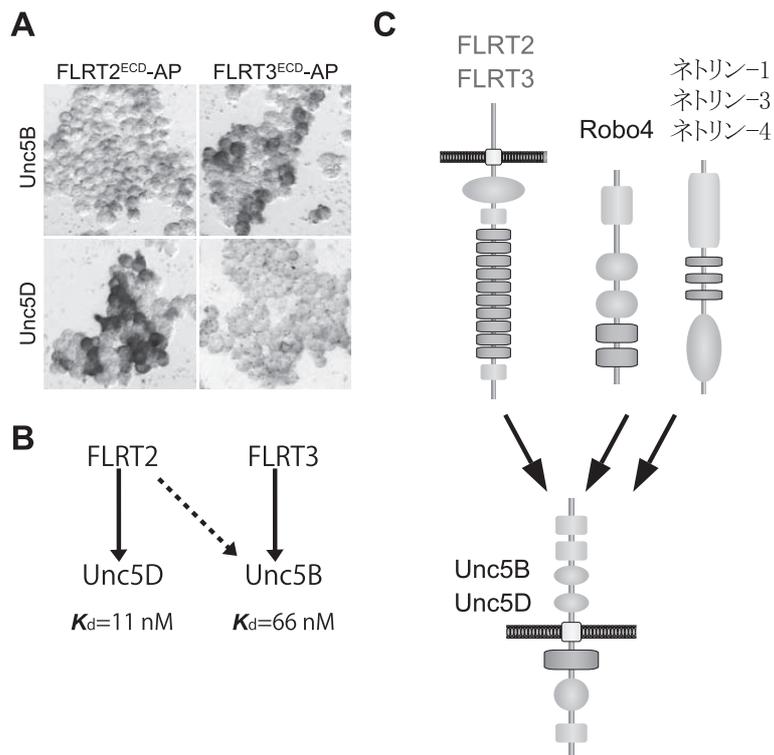


図2 FLRTファミリーとUnc5ファミリーの結合
(A, B) アルカリホスファターゼ (AP) 結合型 FLRT2 および FLRT3 を、Unc5D、Unc5B 過剰発現させた HEK293T 細胞に投与した。FLRT2 は Unc5D と、FLRT3 は Unc5B と強い結合がみられる。(B) FLRT2-Unc5D、FLRT3-Unc5B の解離定数はそれぞれ 11 nM と 66 nM である。(C) 既知の Unc5B・5D リガンドとして、FLRT2、3、Robo4、ネトリン-1、3、4 が知られている。(文献 1 より許可を得て転載)

FLRT2 領域を避けるように移動した。また、タイムラプスによる観察から軸索だけでなく、細胞体自体も反発することが、明らかとなった。すなわち、神経細胞に対する FLRT2 の反発因子としての活性が見いだされた。

既知の Unc5 ファミリーに対するリガンドとしては、FLRT2、3 以外にはガイダンス因子ネトリン-1、3、4、および Robo-4 が知られている¹²⁾ (図 2B)。ネトリン-1 は Unc5 のイムノグロブリンドメインが欠損していても結合できるが、FLRT は結合できなくなる。したがってネトリンと FLRT では Unc5 に対する結合様式が異なると考えられる。

5. FLRT2 による Unc5D 細胞の移動制御

次に我々は FLRT2 と Unc5D の *in vivo* における作用を解析した。胎生 15 日齢のマウス脳において FLRT2 は皮質板の神経細胞に、Unc5D は脳室下帯に存在するマルチポーラー細胞 (多極性細胞) に発現していた。マルチポーラー細胞は水平方向に数本の突起を伸張し、皮質板への移動前に数日間脳室下帯にとどまることが知られている。こ

の細胞群は別称 UL2 (upper layer 2) 細胞とも呼ばれ、皮質板上層へとゆっくり移動し、SatB2 陽性のすばやく移動する UL1 細胞と対比される。我々は FLRT2 が Unc5D 陽性である UL2 細胞の移動を抑制しているのではないかと考えた。この仮説を検証するために FLRT2 ノックアウトマウスを作製し、胎生 15 日齢における大脳皮質 UL2 細胞の分布を解析した。その結果、FLRT2 ノックアウトマウスにおいて、UL2 細胞の分布は野生型に比して上側にシフトしており、上層へと早く移動していることが明らかとなった。実際、分裂中の細胞を BrdU ラベルし、2 日後に BrdU 陽性細胞の分布を観察すると、FLRT2 ノックアウトマウスでは皮質板への到達が早くなっていることも明らかとなった。これらの結果は、FLRT2 が UL2 細胞群の皮質板への移動を反発因子として作用し脳室下帯にとどめていることを示している (図 3C)。

6. おわりに

以上、我々は膜貫通型タンパク質 FLRT2 が Unc5D を受容体とする新規軸索ガイダンス分子であることを見いだ

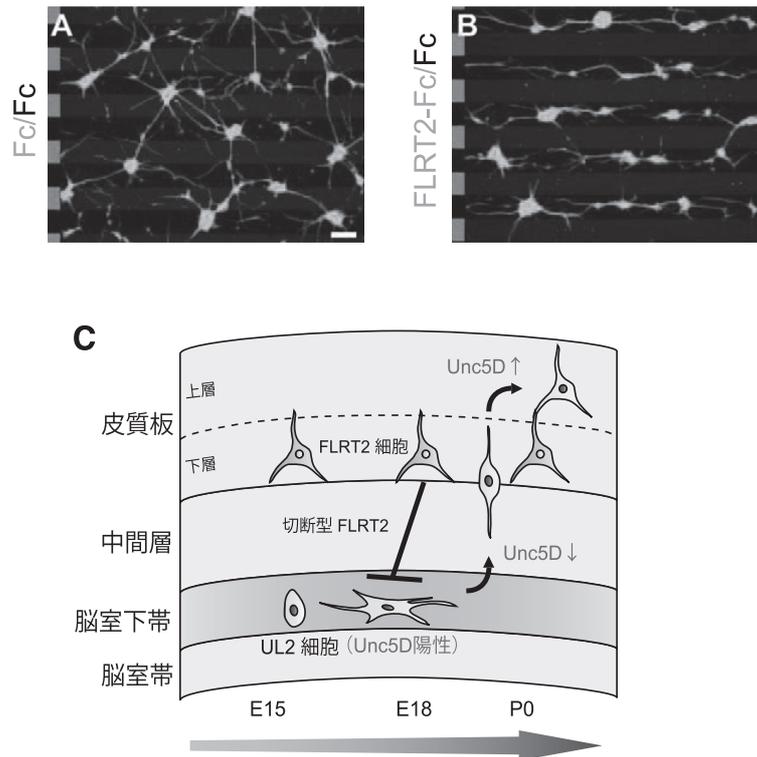


図3 FLRT2によるUL2細胞の放射状移動制御

(A, B) 初代培養海馬神経細胞を、ストライプ状に基質としてコートした対照Fcタンパク質 (A; 緑), FLRT2-Fc (B; 緑) 上で培養した. (B) 24時間後, 神経細胞はFLRT2に対して強い反発作用を示した (赤; 抗Tau1抗体染色). (C) 第V・VI層のFLRT2陽性細胞からFLRT2がSVZに向かって放出され, Unc5D陽性であるUL2細胞の皮質板への放射状移動を抑制している. Unc5Dの発現はFLRT2層をくぐり抜ける際にシャットダウンされ, VI層に到達後再度発現する. (文献1より許可を得て改変)

し, Unc5D陽性である大脳皮質UL2細胞の放射状移動を抑制していることを明らかにした (図3). FLRTファミリーのガイダンス因子としての研究はまだ始まったばかりであるが, ネットリンやセマフォリン等と並ぶ重要な分子であると確信している. 実際, Lopes-Benditoらのグループは, FLRT3がRobo1とシス結合し, DCCを発現上昇させることにより, ネットリンに対して誘引作用をもたらすことを最近報告した¹³⁾. すなわち, FLRTはSlitをリガンドとしたRoboシグナルの調節因子として機能することが示された.

今後は, リガンドおよび受容体としてFLRTの下流においてどのような細胞内シグナル経路を経てアクチン繊維を動かし, 形態変化に結びついているのか解析していきたい. さらに, 神経という分野を越えて, 血管形成・血管新生・腫瘍化等にも関わっているか, 疾患との関連性も解析していきたいと思う.

謝辞

本稿で紹介した研究は, ミュンヘンMax-Planck神経生物学研究所Prof. Ruediger Klein研究室, 浜松医科大学佐藤康二教授の研究室にて遂行されました. この場を借りて厚く御礼申し上げます. 留学に際し, また共同研究の遂行に御尽力いただいた大阪大学山下俊英教授に感謝申し上げます.

- 1) Yamagishi, S., Hampel, F., Hata, K., Del Toro, D., Schwark, M., Kvachnina, E., Bastmeyer, M., Yamashita, T., Tarabykin, V., Klein, R., & Egea, J. (2011) *EMBO J.*, 30, 2920-2933.
- 2) Lacy, S.E., Bönnemann, C.G., Buzney, E.A., & Kunkel, L.M. (1999) *Genomics*, 62, 417-426.
- 3) Karaulanov, E.E., Böttcher, R.T., & Niehrs, C. (2006) *EMBO Rep.*, 7, 283-290.
- 4) Ogata, S., Morokuma, J., Hayata, T., Kolle, G., Niehrs, C., Ueno, N., & Cho, K.W. (2007) *Genes Dev.*, 21, 1817-1831.
- 5) Böttcher, R.T., Pollet, N., Delius, H., & Niehrs, C. (2004) *Nat. Cell Biol.*, 6, 38-44.
- 6) Egea, J., Erlacher, C., Montanez, E., Burtscher, I., Yamagishi, S., Hess, M., Hampel, F., Sanchez, R., Rodriguez-Manzanique, M.T., Bösl, M.R., Fässler, R., Lickert, H., & Klein, R. (2008)

- Gene Dev.*, 22, 3349–3362.
- 7) Tsuji, L., Yamashita, T., Kubo, T., Madura, T., Tanaka, H., Hosokawa, K., & Tohyama, M. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313, 1086–1091.
- 8) Robinson, M., Parsons Perez, M.C., Tébar, L., Palmer, J., Patel, A., Marks, D., Sheasby, A., De Felipe, C., Coffin, R., Livesey, F.J., & Hunt, S.P. (2004) *Mol. Cell Neurosci.*, 27, 202–214.
- 9) O’Sullivan, M.L., de Wit, J., Savas, J.N., Comoletti, D., Otto-Hitt, S., Yates, J.R. 3rd, & Ghosh, A. (2012) *Neuron*, 73, 903–910.
- 10) Karaulanov, E., Böttcher, R.T., Stannek, P., Wu, W., Rau, M., Ogata, S., Cho, K.W., & Niehrs, C. (2009) *PLoS One*, 4, e5742.
- 11) Söllner, C. & Wright, G.J.A. (2009) *Genome Biol.*, 10, R99.
- 12) Koch, A.W., Mathivet, T., Larrivé, B., Tong, R.K., Kowalski, J., Pibouin-Fragner, L., Bouvrée, K., Stawicki, S., Nicholes, K., Rathore, N., Scales, S.J., Luis, E., del Toro, R., Freitas, C., Bréant, C., Michaud, A., Corvol, P., Thomas, J.L., Wu, Y., Peale, F., Watts, R.J., Tessier-Lavigne, M., Bagri, A., & Eichmann, A. (2011) *Dev. Cell*, 20, 33–46.
- 13) Leyva-Díaz, E., del Toro, D., Menal, M.J., Cambray, S., Susin, R., Tessier-Lavigne, M., Klein, R., Egea, J., & López-Bendito, G. (2014) *Curr. Biol.*, 24, 494–508.

著者寸描

●山岸 覚 (やまぎし さとる)



浜松医科大解剖学講座神経機能学分野助教。博士 (理学)。

■略歴 1998年大阪大学理学部生物学科卒業, 2000年同大学院修士, 02年同博士課程修了。同大学医学系研究科ポスドク, 03年千葉大学医学部助手。04年マックスプランク研究所ポスドク。日本

学術振興会特別研究員 (DC2, PD, 海外), EMBO 奨学生。10年より現職。

■研究テーマと抱負 FLRT ファミリーの機能解析。新規軸索ガイダンス因子の探索。研究はすればするほど面白い。生命現象の単純性と複雑性, 相似性と相違性, そして美しさを追求したい。

■趣味 クラシックギター, 音楽鑑賞。